

# 甘蓝脯氨酸脱氢酶基因克隆与 RNAi 表达载体构建

张娜 黄韞宇 冯洁 刘莉莎 杨鹏 赵冰\* 郭仰东\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 通过 RT-PCR、同源克隆和 RACE 等方法由甘蓝总 RNA 扩增得到了甘蓝脯氨酸脱氢酶基因 cDNA 全长 (1 719 bp),其中包含了一个 1 497 bp 的完整开放阅读框,编码 498 个氨基酸,与已发表的十字花科植物 *ProDH* 基因均具有 85% 以上的同源性。在此基础上设计并克隆干扰片段,利用酶切连接的方法将该基因干扰片段正反向插入到载体 pFGC-1008 的 GUS 内含子两侧,经限制性内切酶酶切和测序鉴定,证明植物表达载体 pFGC-gPDH 已构建成功,为进一步研究该基因的功能创造了条件。

**关键词** 甘蓝; *ProDH* 基因; 基因克隆; RNA 干扰; 载体构建

中图分类号 S 635; S 188

文章编号 1007-4333(2011)03-0087-08

文献标志码 A

## Cloning of *ProDH* gene in cabbage and construction of the RNAi vector

ZHANG Na, HUANG Yun-yu, FENG Jie, LIU Li-sha, YANG Peng,  
ZHAO Bing\*, GUO Yang-dong\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** RNA interference (RNAi) targeting *ProDH* suppresses the degradation of proline, and may increase the resistance to drought and salt stress. In this assay, full length cDNA of *ProDH* was cloned with RT-PCR and RACE methods from total RNA of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.). The sequence analysis indicated that it contained 1 719 nucleotides coding for 498 amino acid residues. The *ProDH* gene and its deduced amino acid sequence showed a high degree of sequence homology with the *AtERD5*, *BnProDH*, *BrProDH* and *AsProDH*. The cDNA fragment was chosen to insert into plant vector pFGC-1008 at forward and reverse orientations to construct the recombinant RNAi vector. The RNA interference vector pFGC-gPDH was constructed successfully by restricting endonuclease digestion and sequencing, which would provide a construct for further functional study for drought resistance of plant.

**Key words** cabbage; *ProDH*; gene clone; RNA interference; vector construction

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) 简称甘蓝,为十字花科芸薹属二年生草本植物,在世界各地普遍种植,是欧美各国,也是我国的主要蔬菜作物之一。甘蓝叶片大,蒸腾量较大,在整个生长过程中需水量较多。因甘蓝根系分布浅,在空气干燥,土壤水分不足时,植株生长缓慢、包心延迟,此

时遇高温易引起基部老叶干枯脱落,茎秃露、叶球小而疏松,严重时不能结球<sup>[1]</sup>。

脯氨酸是一种重要的渗透胁迫物质,是水溶性最大的氨基酸。不良环境下植物细胞积累脯氨酸有助于减轻逆境对植物的伤害。在植物细胞生理干旱时,积累高水平的脯氨酸有助于保持细胞或组织的

收稿日期: 2010-09-14

基金项目: 国家“973”计划项目(2009CB119000); 国家大学生创新性实验计划(20081001903); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2009-2-06)

第一作者: 张娜, 硕士研究生, E-mail: zhangna\_cau@163.com; (黄韞宇与第一作者对本文贡献相同, hyy881@gmail.com)

通讯作者: 赵冰, 副教授, 硕士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: zhaobing@cau.edu.cn

郭仰东, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: yaguo@cau.edu.cn

持水能力,可以有效缓解干旱胁迫对植物组织的损伤。另外脯氨酸还可以起到稳定蛋白质、膜和亚细胞结构和清除活性氧的作用,脯氨酸积累可以缓冲胞质内 pH,平衡细胞氧化还原水平<sup>[2]</sup>。

基于目前对脯氨酸代谢过程的理解,P5CS( $\Delta^1$ -二氢吡咯-5-羧酸合酶)和 ProDH(脯氨酸脱氢酶)分别是植物中脯氨酸合成和降解的关键酶,脯氨酸脱氢酶(ProDH)催化脯氨酸生成  $\Delta^1$ -二氢吡咯-5-羧酸(P5C)的反应是脯氨酸降解过程的限速步骤<sup>[2]</sup>。植物的脯氨酸代谢受到非生物胁迫和细胞内脯氨酸浓度的协同调控,在正常情况下,脯氨酸作为一种反馈调节物质抑制了 P5CS 的基因表达而诱导了 ProDH 基因表达。在拟南芥等植物上的研究表明,外源脯氨酸和复水都可以诱导脯氨酸脱氢酶的表达<sup>[3-4]</sup>。

植物中的脯氨酸脱氢酶基因首先在拟南芥中分离得到<sup>[3]</sup>。在紫花苜蓿中分离出 2 个同源性很高、基因结构相似的 ProDH 基因,表明其可能存在一个基因家族<sup>[5]</sup>。其他绿色植物,如烟草、玉米、水稻和甘蓝型油菜等的 ProDH 基因也陆续被分离。

近年来,利用植物基因工程手段,ProDH 基因在植物抗逆等生理过程中的作用得到了进一步阐明。脯氨酸脱氢酶基因反义转化的拟南芥植株对冷害和盐害具有一定的抗性<sup>[6]</sup>。在烟草的悬浮培养细胞系中利用 RNAi 技术使烟草 ProDH 基因表达沉默后,烟草细胞中脯氨酸积累量提高了 1.2~3.0 倍,而 ProDH 基因活性仅为野生型的 4.9%~32.2%,其悬浮愈伤组织的生长和对渗透胁迫耐性都得到了促进和提高<sup>[7]</sup>。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是通过外源或内源性的双链 RNA 在细胞内诱导同源序列的基因表达受到抑制的现象,其表现的性状类似于基因功能缺失产生的表型<sup>[8]</sup>。本研究旨在构建甘蓝 ProDH 基因 RNAi 高效表达载体,为利用 RNAi 技术开展 ProDH 基因的表达抑制及效应的研究打下基础,并通过沉默该基因表达以提高甘蓝耐干旱胁迫能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

植物材料甘蓝为‘中 235’,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

### 1.2 质粒和菌株

干扰载体 pFGC-1008 由本实验室保存,该载体由 CaMV35S 组成型启动子驱动,T-DNA 区段内含有潮霉素筛选标记基因 HYG 和 GUS 基因部分序列作为干扰序列的内含子。大肠杆菌感受态菌株为 DH5 $\alpha$ ,购自天根生化科技有限公司。pMD18-T 克隆载体,pSIMPLE-18EcoRV/BAP 克隆载体购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 酶和其他试剂

EASYspin RNA 提取试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司。各种限制性内切酶购于 NEB 公司,质粒提取试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购于天根生化科技有限公司,反转录试剂、普通 Taq 酶,高保真聚合酶 Pfu、Prime STAR HS DNA 聚合酶,T4 连接酶购于 TaKaRa 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。引物合成由上海生物工程有限公司完成,测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

### 1.4 甘蓝叶片总 RNA 的提取

以 0.5 mol/L 的 L-脯氨酸溶液处理苗龄 1 个月的甘蓝植株,10 h 后取 100 mg 叶片组织,使用 EASYspin RNA 提取试剂盒提取新鲜叶片总 RNA。RNA 电泳采用 1%的琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 甘蓝 ProDH 基因的克隆

参照 GenBank 中拟南芥 AtERD5 基因(GenBank: AK221601.1)、芜菁 S65ERD 基因(GenBank: EU186335.1)、甘蓝型油菜 BnProDH 基因(GenBank: EU375567.1)的序列信息,设计基因全长扩增所需引物(表 1)。以提取的总 RNA 为模板,使用 M-MLV 反转录酶,用引物 3RVN 反转录得到 cDNA 第一链。Taq 酶使用 TaKaRa 公司的高保真聚合酶 Pfu。中部的基因特异性片段的扩增使用引物 P6242 和 P6243, Taq 酶使用 TaKaRa 公司的高保真聚合酶 Pfu;PCR 反应条件为:94 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 1 min,62~67 °C 温度梯度退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环;最后一轮延伸 72 °C 4 min;4 °C 保温。3' RACE 进行了 2 轮巢式 PCR 扩增,第二轮模板为上一轮的产物稀释 100 倍,引物分别为 3R<sup>[9]</sup>和 3R2, 3R 和 3R3, Taq 酶使用 TaKaRa 公司的 Prime STAR HS DNA

表 1 甘蓝 *ProDH* 基因克隆所用的引物序列

Table 1 PCR primers used in the *ProDH* gene cloning

引物名称	引物序列
P6242	5'-CCATATCTCCTCTTTAT-3'
P6243	5'-TCTACTTACTTTCC-3'
3RVN	5'-GACTCGAGTCGACATCGATTT- TTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'
3R	5'-GACTCGAGTCGACATCGA-3'
3R2	5'-GTGGTCGTGAAGATAACTGCG-3'
3R3	5'-GATGCTGCCTCTTGTGATGAT-3'
5DD	5'-ATGGCAGCCCGCCTCCT-3'
5DUAN	5'-ATGGCAGCCCGCCTCCTC-3'
5ANTI1	5'-CGTGGACTGGTGACTTGTGCC-3'
5ANTI2	5'-TTCCACCGAAGCAAATCACT-3'

聚合酶,PCR 产物回收纯化,先使用 TaKaRa 公司的 DNA Kination kit 进行磷酸化,再与 pSIMPLE-18EcoRV/BAP 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆测序。5'端序列的克隆使用同源克隆的方法,共设计使用了 2 组基因特异性引物 5DD 和 5ANTI1,5DUAN 和 5ANTI2,同样采用巢氏 PCR 进行扩增。PCR 产物回收纯化,与 pMD18-T 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆测序。

分别获得 3 段目的基因片段后,使用 DNAMAN 软件将扩增得到的 3 段目的基因片段进行拼接,得到甘蓝 *ProDH* 基因 cDNA 全长,再进行同源性比对与分析。

### 1.6 甘蓝 *ProDH* 基因 RNAi 植物表达载体的构建

根据已得到的甘蓝 *ProDH* 基因全长序列,选择了长为 476 bp 区段作为 RNA 干扰最佳靶位区段设计一对特异性引物,为了便于定向连接到中间载体 pFGC-1008,在反向干扰片段引物 GLGRA 引入酶切位点 *Asc* I 和 *Swa* I,在正向干扰片段引物 GLGRS 引入酶切位点 *Spe* I 和 *Pac* I。GLGRA1:5'-AGGCGCGCCTGTGGACTGGTGACTTGTGCC-3'; GLGRA2: 5'-ATTTAAAT AGTGATTTGCTTCGGTGGG-3' 和 GLGRS1: 5'-GACTAGTCGTGGACTGGTGACTTGTGCC-3'; GLGRS2: 5'-

CCTTAATTAAGGAGTGATTTGCTTCGGTGGG-3' (划线部分为酶切位点)。以 cDNA 为模板,用以上 2 对引物分别扩增,纯化回收特异片段 GRA 和 GRS,与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性单克隆进行测序,正确克隆命名为 pGRA 和 pGRS,提取质粒。载体构建流程(图 1)用 *Asc* I 和 *Swa* I 分别酶切 pGRA,得到大小为 500 bp 左右的目的片段割胶纯化回收,并将经过同样内切酶分别酶切的载体 pFGC-1008 通过乙二醇沉淀法进行纯化回收,将二者用 T4-DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌感受态,挑取阳性单克隆,进行 PCR 检测,测序鉴定,阳性克隆命名为 pFGC-GRA,提取质粒;再用 *Spe* I 和 *Pac* I 分别酶切 pGRS 和 pFGC-GRA,

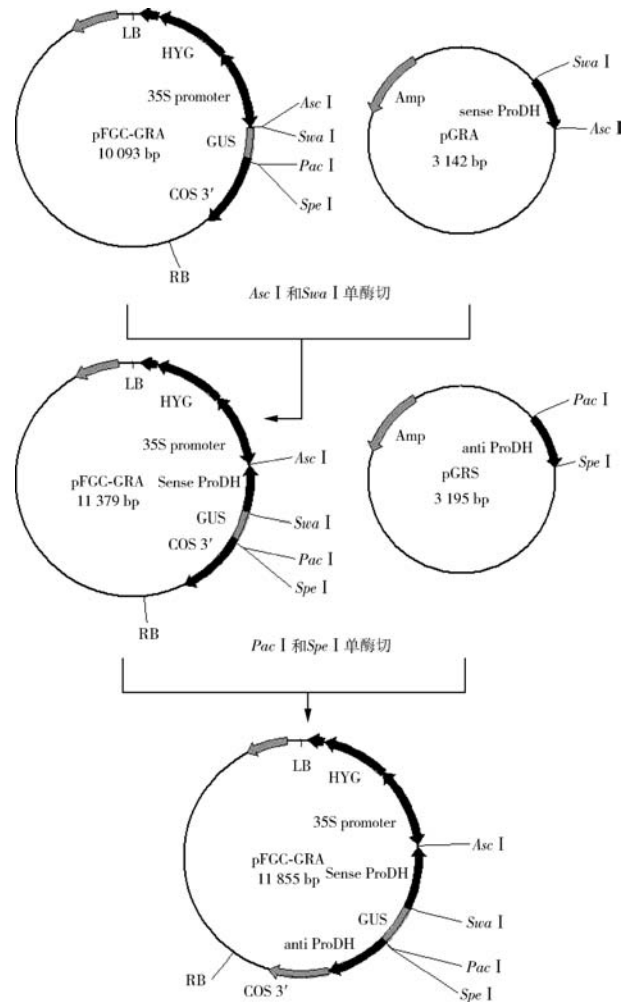


图 1 RNAi 植物表达载体 pFGC-gPDH 构建示意图

Fig. 1 Construction of a RNAi expression vector of pFGC-gPDH

得到的片段纯化后连接,转化大肠杆菌感受态,挑取阳性单克隆,提取质粒命名为 pFGC-pPDH,进行 PCR、酶切和测序鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 甘蓝叶片总 RNA 的提取

通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 质量(图 2),结果表明:28S、18S 和 5S rRNA 条带均清晰完好,说明提取的总 RNA 完整性良好,可以作为下一步试验的材料。

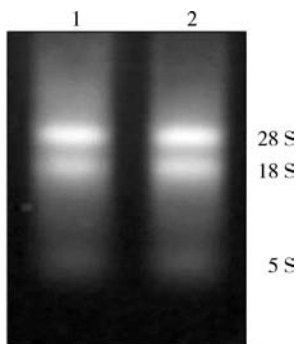


图 2 甘蓝叶片总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of RNA from the fresh leaf of cabbage

### 2.2 目的基因的克隆

以总 RNA 为模板,使用 Takara 公司的 M-MLV 反转录系统获得 cDNA 第一链。用甘蓝类植物 actin 蛋白基因作为对照设计引物进行 PCR 扩增,结果均呈阳性,证明 cDNA 是可用的。

通过 PCR 扩增获得的中部基因片段长 625 bp,将其与 GenBank 中已登记的十字花科作物脯氨酸脱氢酶基因序列进行 Blast 同源性比较(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>),结果表明:该片段与拟南芥、甘蓝型油菜和芜菁等的 *ProDH* 基因都有很高的同源性,初步证实其为甘蓝 *ProDH* 基因中部的一段序列。3'RACE 进行了 2 轮 PCR 扩增,得到长度为 1 137 bp 的 3'端序列的目的片段;5'端通过 2 对同源引物扩增得到长度为 645 bp 的 5'端序列片段。利用 DNAMAN 软件进行拼接,获得总长为 1 719 bp 的目的基因条带。

### 2.3 甘蓝 *ProDH* 基因的核酸序列与蛋白序列分析

对克隆得到的 *ProDH* 基因 cDNA 核酸序列同已报道的其他十字花科植物 *ProDH* 基因进行比对

分析,发现其与青花菜 *BoProDH* 基因(GenBank: GU568241. 1)、芜菁 S65ERD5 基因(GenBank: EU186335. 1)、甘蓝型油菜 *BnProDH* 基因(GenBank: EU375567. 1)、拟南芥 *AtERD5* 基因(GenBank: NM 113981. 5)和基隆南芥 *AsProDH* 基因(GenBank: HM013940. 1)分别有 99%、97%、89%、86%和 87%的同源性。

使用 DNAMAN 分析所得核酸序列的开放阅读框,发现其有一个长 1 497 bp 的完整的最大开放阅读框,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,编码一条含 498 个氨基酸,分子量约 55.19 ku 的甘蓝脯氨酸脱氢酶蛋白。将所得氨基酸序列与已报道的基因比对,其与青花菜 *BoProDH* 基因(GenBank: GU568241. 1)、芜菁 S65ERD5 基因(GenBank: EU186335. 1)、甘蓝型油菜 *BnProDH* 基因(GenBank: EU375567. 1)、拟南芥 *AtERD5* 基因(GenBank: NM 113981. 5)和基隆南芥 *AsProDH* 基因(GenBank: HM013940. 1)所对应的推导氨基酸序列分别有 99%、98%、91%、89%和 91%的同源性,证明了克隆得到的序列为甘蓝 *ProDH* 基因序列。

将翻译得到的甘蓝脯氨酸脱氢酶氨基酸序列与其他真核生物(包括动物、植物、真菌等)脯氨酸脱氢酶氨基酸序列比对,发现序列的部分区域具有高度保守序列,而这些保守区域在原核生物中也是相似的(图 3)。

### 2.4 中间载体 pFGC-GRA 和 RNAi 植物表达载体 pFGC-gPDH 的 PCR 鉴定

以反向干扰片段的引物 GLGRA1 和 GLGRA2 验证中间载体 pFGC-GRA,扩增出 500 bp 左右的条带如图 4,证明反向干扰片段已成功连接上干扰载体。pFGC-gPDH 上由于既有正向片段又有反向片段,进行 PCR 验证需重新设计引物。根据该载体上正向片段上下游的序列设计出一对引物 ZLDZ 和 ZLDF,进行 PCR 验证,扩增得到 800 bp 左右的条带,该条带包括 500 bp 左右正向干扰片段及其长约 300 bp 左右的上下游部分序列,由此也初步证明正向干扰片段已成功与干扰载体连接。ZLDZ: 5'-ATGAACTGCTGCTGTCGG-3', ZLDF: 5'-TAGCGTCTCGCATATCTC-3'。

```

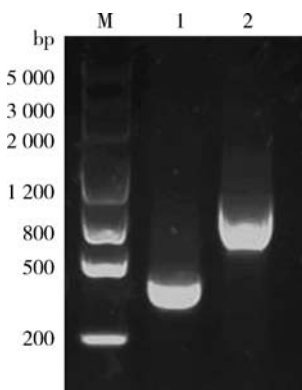
1 M A A R L L R T N F I R R P Y R F S A L S P V G Q P T V T A
1 ATGGCAGCCCGCCTCCTCCGAACAACTTTATCCGTCGTCCTTACCGTTTCTCCGCTTTGAGCCCGGTGGGTGAGCCACCGTGACAGCT
31 S T A V V P E I L S F G Q Q A P E P P V P H P K P N E A H N
91 TCAACCGCAGTCGTCGCCGAGATACTCTCCTTCGGACAACAAGCGCCAGAGCCACCTGTCCCCACCCAAAGCCAAACGAAGCTCACAAT
61 D I D L S D Q A R L F A S V P T S D L L R S T A V L H A A A
181 GACATCGATCTGTCCGACCAAGCCCGTCTCTTTGCCCTGTCCCCACCTCCGATCTTCTCCGCTCCACCGCGGTGCTGCATGCGGCGCGC
91 I G P M V D L G S W V M S S K L M E T A L T R D M V L R L V
271 ATAGGTCTATGGTGGATCTGGATCGTGGGTACGATGTTCTAAACTCATGAAAACCGCGTTAACACCGTGACATGGTCTTCGACTTGTG
121 K S T F Y D H F C A G E D A D A A A Q R V R S V Y E A T G L
361 AAAAGTACGTTTTATGACCATTTCTGCGCCGGTGAAGACGCTGACGACGCGCGCAGCGCGTAAAGAAGTGTTTACGAGGCTACGGGTCTT
151 K G M L V Y G V E H A D D A A S C D D N M H H F L R T I E A
451 AAAGGTATGCTTGTGTACGGCGTTGAACACGCGGATGATGCTGCCTCTTGTGATGATAACATGCACCATTTCCCTTCGAACCATTGAAGCT
181 A K S L P T S H F S S V V V [K] I T A I C P I S L L K R V S D
541 GCCAAATCGTTACCAACATCTCACTTTAGCTCAGTGGTTCGTAAGATAACTGCGATTGTCCCATTAGTCTTCTAAACGAGTGGATGAT
211 L L R W E Y K T K N F K L S W K L K S F P V F S D S S P L Y
631 TTGCTTCGGTGGGAATACAAGACTAAGAAGCTTTAAACTCTCATGGAAGCTCAAATCGTTTCCGGTTTTCTCCGATTCAAGCCCTCTTTAC
241 H T N S E P E P L T A E E E R E L E A A H V R I Q D I C R K
721 CACACAAACTCAGAACCGGAACCCCTTAACCGCGAAGAAGAACGGGAGCTCGAAGCAGCACACGTAAGGATCCAAGACATCTGTTCGTAATA
271 C Q E S N V P L L V [D] [A] [E] D T I L [Q] P A I D Y M A Y S S A I
811 TGCCAAGAGTCTAATGTACCTTTGCTGGTTCGATGCTGAAGACACAATCCTCCACCGGCGATCGACTACATGGCTTACTCATCAGCGATC
301 L F N A D K D R P I V Y N [T] [I] [Q] [A] [Y] [L] R D A G E R L H L A V
901 TTGTTCAATGCGGACAAAGACAGACCTATTGTTTACAACACGATTCAGGCCTACTTGAGAGACGCTGGTGAGAGGTTGCATTGGCCGTA
331 Q E A E K E N V P M G F [K] [L] [V] [R] [G] [A] [Y] M S S E A R L A D S L
991 CAAGAAGCCGAGAAGGAAAATGTTCCATGGGCTTTAAGTTGGTGGAGGTTGCTTATATGTCTAGTGAAGCTAGGCTGGCAGATTCCCTTG
361 G N K S P V H D T I Q N T H D C Y N N C M T F L M E K A S N
1081 GGAACAAGTCCACAGTCCACGACACAATCAGAACACGCAGGATTGCTACAATAACTGCATGACTTTCCTAATGGAGAAAGCCCTCAAAC
391 G S G F G V L A T [H] N A D S G R L A S K K A S E L N I D K
1171 GGTTCGGGTTTTGGTGTGGTTCTTGGCAACACATAACGCTGACTCTGGGAGACTTGCATCAAAGAAAAGCAAGTGAAGTCAATATCGATAAA
421 E N G K I E F A [Q] [L] [Y] [G] M S D A L S F G L K R A G F N V S [K]
1261 GAGAACGGGAAGATAGAGTTTGGCAGCTATACGGTATGTCAGATGCATTGTCCTTCGGTTTTAAGAGGGCCGGGTTCAATGTTAGCAAG
451 [Y] M P F [G] P V E T A I P [Y] [L] V [R] [R] [A] [Y] [E] N R G M M A T G A T
1351 TACATGCCATTCGGACCGGTGCAAAACCGCTATACCTTATCTTGTCCGACGTGCTTATGAGAACCGGGGAATGATGGCCACGGGAGCCACT
481 D R H L M R M E L K R [R] L L A G N A *
1441 GACCGTCATCTCATGAGGATGGAGCTTAAGAGGAGATTACTCGCCGAAATGCGTGA

```

浅色方框为真核生物脯氨酸脱氢酶氨基酸序列中高度保守的部分；深色方框为真核及原核生物都高度保守的部分。

图 3 甘蓝 *ProDH* 基因 cDNA 编码区及其推导氨基酸序列分析

Fig. 3 cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of Cabbage *ProDH*



M 为 marker；1 为以 pFGC-GRA 为模板扩增出的反向片段；2 为以 pFGC-gPDH 为模板扩增出的含正向片段及其所在的干扰载体上下游的部分序列。

图 4 pFGC-GRA 和 pFGC-gPDH 的 PCR 验证

Fig. 4 PCR amplification of pFGC-GRA and pFGC-gPDH

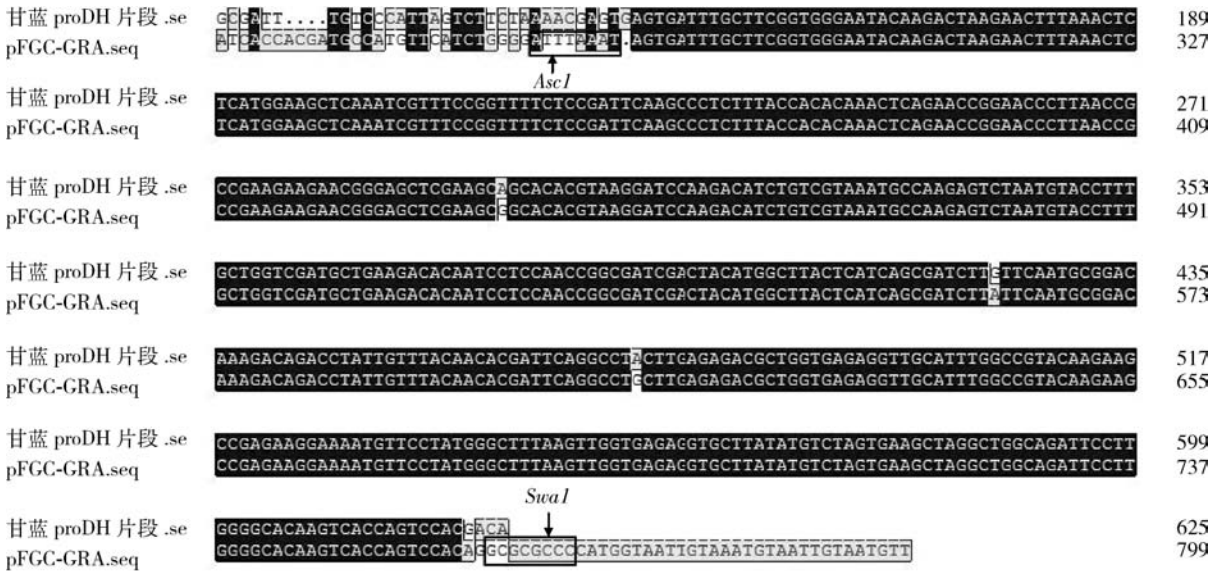
### 2.5 中间载体 pFGC-GRA 和 RNAi 植物表达载体 pFGC-gPDH 的测序鉴定

将含有反向片段和载体 pFGC-1008 连接后的

质粒 pFGC-GRA 的测序结果跟设计的甘蓝 *ProDH* 基因干扰序列对比(图 5)。正向片段和载体 pFGC-GRA 连接后的质粒 pFGC-gPDH 测序, 测序结果(图 6)表明干扰序列的主体部分和甘蓝 *ProDH* 基因序列均具有很高的同源性, 连接到干扰载体上的正向和反向片段的 4 个酶切位点 *Asc* I、*Swa* I、*Pac* I 和 *Spe* I 均保存完好, 表明正、反向片段已经成功地连接到干扰载体上。

### 2.6 pFGC-gPDH 载体酶切鉴定

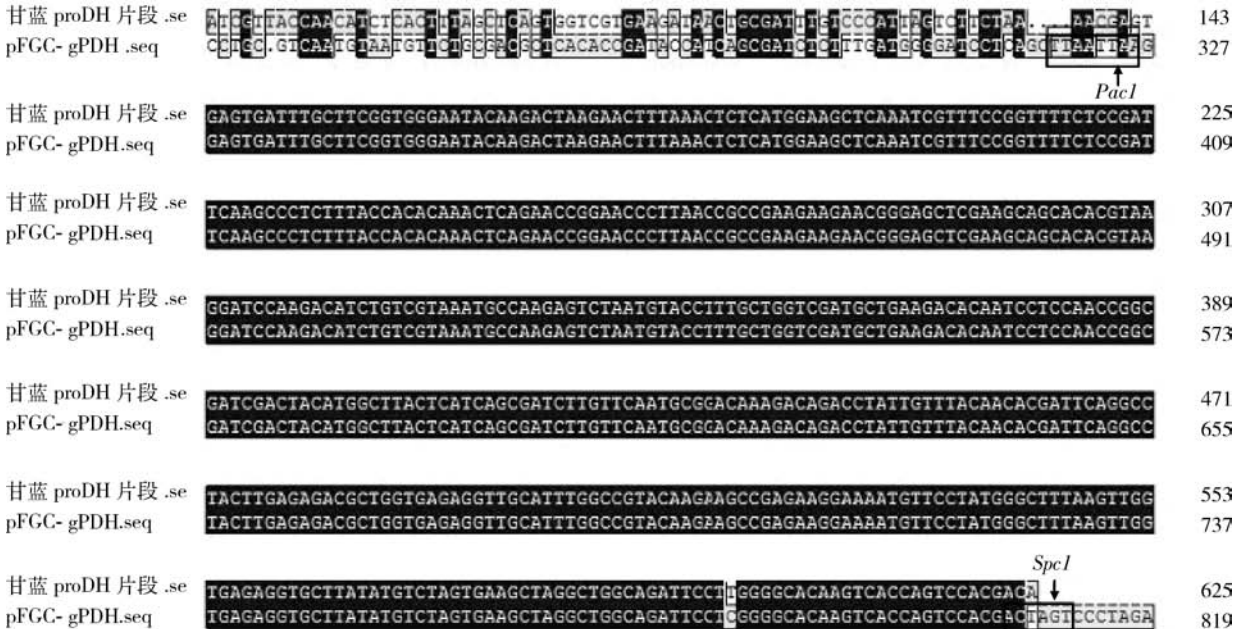
根据构建的 pFGC-gPDH 载体进行酶切位点分析, 发现载体序列中有 2 处均含有 *Bss*H II 酶切位点, 分别位于插入的反向干扰片段上游及正向干扰片段下游。利用内切酶 *Bss*H II 对载体进行酶切, 得到了包含正反向干扰片段以及中间内含子的大小符合预期的目的片段(图 7), 证明甘蓝 *ProDH* 基因 RNAi 植物表达载体 pFGC-gPDH 构建成功。构建好的干扰载体 T-DNA 区如图 8 所示。



黑色代表同源性级别为 100%；方框所包含序列代表载体上所选择的酶切位点。

图 5 质粒 pFGC-GRA 测序结果和甘蓝 ProDH 基因 cDNA 序列比对结果

Fig. 5 Alignment of sequencing result of pFGC-GRA and cDNA of ProDH



黑色代表同源性级别为 100%；方框所包含序列代表载体上所选择的酶切位点。

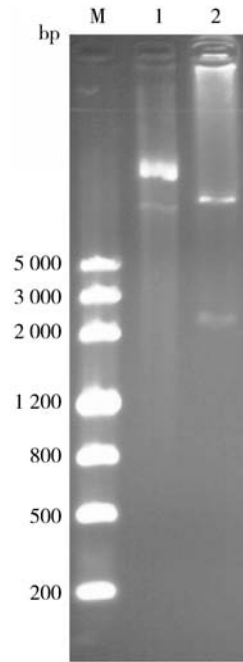
图 6 质粒 pFGC-gPDH 测序结果和甘蓝 ProDH 基因 cDNA 序列比对结果

Fig. 6 Alignment of sequencing result of pFGC-gPDH and cDNA of ProDH

### 3 讨 论

基因沉默(gene silencing) 现象为研究植物基因表达调控及鉴定基因功能提供了新的途径。RNA 干扰自从发现以来,已经被广泛的应用于多种植物基因功能研究试验中有效地阻断特异基因的表达。构建番茄红素 β 环化酶基因(*Lyc-β*) RNAi 载体并转化番茄,转化株中 *Lyc-β* 的 mRNA 含量明显降低,其转基因植株中番茄红素含量提高<sup>[10]</sup>。利用 RNAi 技术构建大豆类受体蛋白激酶基因(*rlpk2*) 双元表达载体并转基因, RT-PCR 分析表明 *rlpk2* 基因已被成功敲减,并发现敲减大豆叶片中 *rlpk2* 基因表达,明显改善大豆叶片光合能力<sup>[11]</sup>。

RNAi 技术的关键在于选择目标基因构建高效的 RNA 干扰表达载体<sup>[12]</sup>。Wesley 等研究表明用含有内含子的发夹 RNAi(Intro-containing Hairpin RNA, ihpRNA)结构表达 dsRNA 的植物中,90%表现出沉默效应,而用发夹 RNA(Hairpin RNA, hp-RNA)、正义和反义结构分别仅有 58%、13% 和 12% 的沉默效应<sup>[13]</sup>。本研究所用的干扰载体 pFGC1008 有一段 GUS 基因序列作为内含子,该序



M 为 DNA Maker; 1 为未酶切质粒; 2 为 *Bss* H II 酶切得到的目的片段。

图 7 载体质粒 pFGC-gPDH 酶切鉴定电泳图

Fig. 7 Restriction enzyme analysis of plasmid pFGC-gPDH

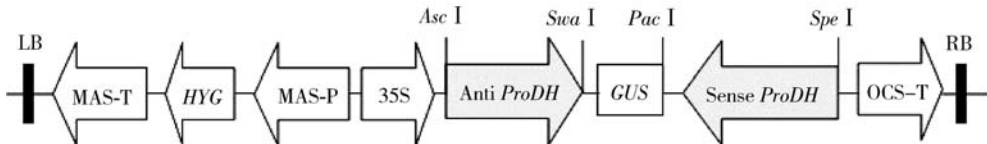


图 8 pFGC-gPDH 载体真核表达框示意图

Fig. 8 Structure map of pFGC-gPDH expressing framework

列作为连接正反向片段的的内含子序列已经被证明在植物的 RNAi 中具有很高的干扰效率<sup>[14]</sup>。

脯氨酸脱氢酶是脯氨酸分解代谢的关键酶, *ProDH* 基因编码脯氨酸脱氢酶,本研究首次克隆了甘蓝的 *ProDH* 基因 cDNA 全长 1 719 bp,含有一个开放阅读框(1 497 bp),编码 498 个氨基酸。为进一步研究该基因的功能及作用方式,本研究选取高度保守序列,成功构建了能转录为 476 bp 的 dsRNA 的 RNA 干扰载体 pFGC-gPDH。目前正在对甘蓝的转化工作,以期得到耐干旱胁迫的甘蓝种质新资源。

### 参 考 文 献

[1] 张振贤. 蔬菜栽培学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2003;

270-273  
 [2] Verbruggen N, Hermans C. Proline accumulation in plants; A review[J]. *Amino Acids*, 2008, 35: 753-759  
 [3] Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8: 1323-1335  
 [4] Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, et al. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1233-1241  
 [5] Miller G, Stein H, Honig A, et al. Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation [J]. *Planta*, 2005, 222: 70-79  
 [6] Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, et al. Antisense

- suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Letters, 1999, 461: 205-210
- [7] Yoshiko T, Tsuyoshi N, Muneharu E. Osmotolerance and growth stimulation of transgenic tobacco cells accumulating free proline by silencing proline dehydrogenase expression with double-stranded RNA interference technique [J]. Physiologia Plantarum, 2005, 125: 224-234
- [8] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811
- [9] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 654
- [10] 马超, 马兵钢, 郝青南, 等. 番茄红素  $\beta$  环化酶基因 (*Lyc- $\beta$* ) RNAi 载体构建及表达鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (1): 10-17
- [11] 李小平, 邓楠, 马媛媛, 等. 大豆类受体蛋白激酶基因 (*rlpk2*) RNAi 双元表达载体的构建及转基因 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39 (1): 1-8
- [12] 徐化学, 熊建华, 傅彬英. 应用 Gateway 技术构建水稻 *OsDAD1* 基因的 RNA 干涉载体 [J]. 分子植物育种, 2007, 5 (1): 133-136
- [13] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A. Construct design for effective and high-throughput gene silencing in plant [J]. Plant Journal, 2001, 27 (6): 581-590
- [14] 杨鹏, 刘莉莎, 郭仰东, 等. 青花菜 *ProDH* 基因的克隆及功能鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29 (2): 206-214

(责任编辑: 王燕华)

## · 科研简讯 ·

### 公益性行业(农业)科研专项“最佳养分管理技术研究与应用”通过验收

受农业部财务司和科技教育司委托,农业部科技发展中心组织有关专家,对公益性行业(农业)科研专项“最佳养分管理技术研究与应用”进行验收。

该项目于 2008 年启动,由我校主持,参加单位有中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、吉林大学、扬州大学、东北大学、湖南农业大学、河北农业大学、山东农业大学、河南农业大学、石河子大学、四川省农科院土壤肥料研究所、河北省农林科学院、山东省农科院土壤肥料研究所、吉林省农科院农业环境与资源研究中心、青岛农业大学、内蒙古农业大学、华南农业大学、云南农业大学、西南大学、河南省农科院土壤肥料研究所、西北农林科技大学、山西省农科院土壤肥料研究所、甘肃省农科院土壤肥料研究所、中国热带农业科学院、华中农业大学、中科院新疆生态与地理研究所和南京农业大学等 27 个科研单位。

会上,该项目首席专家张福锁教授汇报了课题业务完成情况和财务执行情况,其他 12 家代表性协作单位专家汇报了子课题业务完成情况。经过 3 年的努力,项目取得一系列重大进展和标志性成果:多学科结合突破了高产群体构建与高效养分根层调控相匹配的最佳养分管理等共性关键技术,针对区域限制因素,建立了在现有基础上产量增长 10%~15%、节肥 20%~30%,氮肥生产效率提高 20%的区域技术体系;突破了水肥难于协调的关键问题,因地制宜地发展了多种果树、蔬菜水肥一体化精量调控技术及其配套物化产品;突破了技术科学性与区域可操作性的难题,建立了全国养分管理技术指标体系,实现了技术从田块到区域拓展及应用的综合化和简化,为全国测土配方施肥提供技术支撑;建立了农田和区域宏观养分管理研究平台,提出政策建议,为国家尺度养分分配、流动和管理提供技术支撑。项目以试验基地为核心,通过技术简化、物化、机械化以及各种农民自发组织进行大面积示范推广。3 年累计示范推广 220.27 万  $\text{hm}^2$ ,增产粮食、蔬菜、水果共计 192 万 t,增加农民收入 39.7 亿元,实现作物高产、资源高效和环境友好等目标,具有广阔的应用前景。

项目研究专家对项目予以高度评价,一致认为该项目目标明确,研究内容饱满、内容设置科学,组织管理规范,已按照考核指标要求全面完成了任务书规定的项目计划目标和任务,对行业发展和学科发展有很大的促进作用。

(摘自中国农大校园网)